

ХОЛОДОВА ІНГІБІЦІЯ БІОАКТИВНОСТІ ПРОБІОТИЧНИХ МІКОБАКТЕРІЙ І АЕРОКОКІВ У МІКРОБІОМІ МУРЧАКІВ

В. В. Зажарський¹, канд. вет. наук, доцент,
А. О. Сосницька¹, аспірантка,
А. П. Палій², д-р вет. наук, професор,
І. А. Бібен², канд. вет. наук, доцент

¹Дніпровський державний аграрно-економічний університет,
вул. С. Єфремова, 25, м. Дніпро, 49600, Україна
zazharskiyv@gmail.com

²ННЦ «ІЕКВМ»
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023, Україна

*Організм сільськогосподарських тварин постійно знаходиться під впливом різноманітних факторів зовнішнього середовища і одним з негативних чинників порушення технології утримання та створення незадовільних умов існування з погіршенням добробуту є холодова травма. Здебільшого це проявляється як перманентна дія позитивних температур значно нижче фізіологічної норми або періодичні коливання некомфортної температури. Такий стрес-фактор низької інтенсивності, але перманентний впродовж довгого проміжку часу викликає негативні патофізіологічні зміни в макроорганізмі з розвитком імунодепресії, метаболічного синдрому, перверзій якісного складу мікробіому і, як наслідок, порушення нативних фізіологічних процесів стимуляції клітинних механізмів неспецифічного вродженого імунітету, індукованого імунобіологічними механізмами функціонування нейтрофільних гранулоцитів. Негативний вплив перманентного холодового стресу низької інтенсивності вивчали на модельному об'єкті – мурчаках, яких утримували впродовж двох тижнів при температурі 4-6 °С в умовах обмеження світла і пересування. Перед початком дослідження провели стартові мікробіологічні дослідження мікробіому товстого кишечника загальноприйнятими методами. Були ізольовані резидентні індигенні пробіотичні прокаріоти – *M. vaccae* & *A. viridans*, які володіли типовими видовими характеристиками. Патогенних варіантів ентеробактерій не виділили, ізольовані культури *E. coli* були апатогенними і відносились до звичайної нормофлори. Двоптижнева холодова травма призвела до того, що індигенні пробіотичні мікробіонти *M. vaccae* & *A. viridans*, які є індикаторними прокаріотами фізіологічного благополуччя макроорганізми, зникли з мікробіому. При цьому збільшилась кількість потенційно-патогенних ентеральних мікроорганізмів, кокової і паличкової форми. Це корелювало зі зниженням фагоцитарної активності нативних нейтрофільних гранулоцитів і їх преформованих філаментозних просторових нуклеопротектинних сітчастих структур, опосередковуючих дефрагментарну функцію по відношенню до генетично несингенних об'єктів.*

Ключові слова: *Mycobacterium vaccae*, *Aerococcus viridans*, МУРЧАКИ, ГІПОТЕРМІЯ, ІМУННОСУПРЕСІЯ, НЕЙТРОФІЛЬНІ ГРАНУЛОЦИТИ.

COLD INHIBITION OF BIOACTIVITY OF PROBIOTIC MYCOBACTERIA AND AEROCOCCI IN THE MICROBIOME

V. V. Zazharskyi¹, A. O. Sosnytska¹, A. P. Paliy², I. A. Biben¹

¹Dnipro State Agrarian and Economic University,
S. Efremova str., 25, Dnipro, 49600, Ukraine
zazharskiyv@gmail.com

²NDC "IEKVM"
Pushkinska str., 83, Kharkiv, 61023, Ukraine

The organism of farm animals is constantly under the influence of various factors of the external environment, and one of the negative factors of violation of the technology of keeping and creation of unsatisfactory conditions of existence with deterioration of well-being is cold injury. Mostly it manifests itself as a permanent effect of positive temperatures well below the physiological norm or periodic fluctuations of an uncomfortable temperature. Such a stress factor of low intensity, but permanent over a long period of time, causes negative pathophysiological changes in the macroorganism with the development of immune-depression, metabolic syndrome, perversions of the qualitative composition of the microbiome and, as a result, disruption of native physiological processes of stimulation of cellular mechanisms of nonspecific innate immunity, induced by immunobiological mechanisms of the functioning of neutrophil granulocytes. The negative effect of low-intensity permanent cold stress was studied on a model object - murchakas, which were kept for two weeks at a temperature of 4-6 °C under conditions of light and movement restriction. Before the start of the experiment, initial microbiological studies of the microbiome of the large intestine were conducted using generally accepted methods. Resident indigenous probiotic prokaryotes - *M. vaccae* & *A. viridans*, which possessed typical species characteristics, were isolated. Pathogenic variants of enterobacteria were not isolated, isolated cultures of *E. coli* were apathogenic and belonged to the usual normal flora. A two-week cold injury resulted in the disappearance of the indigenous probiotic microbiota *M. vaccae* & *A. viridans*, which are indicator prokaryotes of the physiological well-being of the macroorganism, from the microbiome. At the same time, the number of potentially pathogenic enteral microorganisms, coccal and rod-shaped, increased. This was correlated with a decrease in the phagocytic activity of native neutrophil granulocytes and their preformed filamentous spatial nucleoprotective mesh structures, which inhibit the de-fragmentary function in relation to genetically non-syngenic objects.

Keywords: *MYCOBACTERIUM VACCAE*, *AEROCOCCUS VIRIDANS*, MURCHAKAS, HYPOTHERMIA, IMMUNOSUPPRESSION, NEUTROPHILIC GRANULOCYTES.

Довготривалий холодний вплив невисокої інтенсивності та періодичне охолодження – широко розповсюджені порушення зоогігієнічних умов утримання тварин і псування добробуту їхнього існування, як біологічної структури з певними біологічними потребами. Зниження рівня фізичного комфорту і біоблагополуччя призводять до розвитку стрес-реакції на дисфункціональний вплив зовнішнього середовища і появи негативних наслідків патофізіологічних змін в метаболічних реакціях і структурі загального гомеостазу макроорганізму, як цілісної біологічної системи зі стабільними фізіологічними параметрами біоіснуванн. Гіпотермія в перспективі віддалених і безпосередніх негативних наслідків для загального фізіологічного стану і адаптивно-компенсаторних потенцій організму викликає розвиток холодової хвороби з різноманітним симптомокомплексом хворобливих проявлень, корелюючих з важкістю пошкоджуючих факторів, і це впливає на всі системи з регуляторно-координуючими та симультанними функціями (Mallet, 2002; Ganem et al., 2006; Mohr et al., 2009).

В більшості випадків для припинення негативних наслідків гіпотермії, санування організму і відновлення порушених фізіологічних функцій органів і тканин потрібне лікувально-медикаментозне втручання з використанням фармакологічних засобів різноманітних функціонально-корегуючих груп, включаючи нестероїдні аналгетики, гемореологічні та кардіоваскулярні засоби, актопротективні, стимулювальні і вітамінно-мінеральні препарати, а також загальноукріплюючі кормові добавки та пробіотичні мікробіоти в асоціації і в комбінації з пребіотиками (Mohr et al., 2009; Allen et al., 2010; Mattox et al., 2012; Biben et al., 2018; Zazharska & Biben, 2023).

В адаптогенезі до холодого стресу невисокої інтенсивності, але який діє перманентно, довготривало організм реагує комплексно з залученням симпатичної периферичної нервової системи і змінами метаболічної активності та терморективності, також в регуляції чутливості до холодого шоку беруть участь адренореактивні і холінреактивні системи, нервово-трофічна ланка і імунобіологічна відповідь інтегральних систем адаптивно-компенсаторних біомеханізмів з підтримання загального гомеостазу внутрішнього середовища. Але перманентна дія температурного подразника в діапазоні невисоких позитивних температур, які нижче рівня фізіологічного комфорту призводять до різкого зниження добробуту тварин та негативних наслідків у фізіологічних процесах підтримки життєздатності і нормального функціонування систем і органів організму, окремо це стосується кількісного і якісного прокаріотичного складу мікробіому товстого кишечника (Mohr et al., 2009; Allen et al., 2010; Zazharska, 2023).

Організм теплокровних тварин є відкритою біосистемою, де відбувається постійний обмін речовин, енергії та інформації з зовнішнім середовищем в екологічній ніші існування популяції даного виду. Відкритість торкається перш за все травного тракту, який функціонує як хемостатична система постійного культивування мікробіому макроорганізму, де співіснують сотні видів мікробіотів, представники всіх існуючих доменів. Взаємодія динамічного мікробіального органу з макроорганізмом відпрацьовувалася протягом всього еволюційного розвитку кожного виду макроорганізмів. Тому кількісний і якісний склад мікробіому має величезне значення для підтримки нормального функціонування кожного організму. Серед великої кількості видів прокаріот, які населяють товстий кишечник, як екологічну нішу існування, найбільше значення для підтримки норергічного функціонування всіх органів і систем макроорганізму найбільше значення мають резидентні індигенні убіквітарні прокаріоти з вираженою пробіотичною активністю. В досліджах відомих вчених було встановлено, що такі пробіотичні мікроорганізми як *Mycobacterium vaccae* та *Aerococcus viridae* є показниками нормергічного стану макроорганізму і завжди присутні в клінічно здоровому організмі і зникають з мікробіому при різноманітних запально-дегенеративних процесах та інфектопатології. Ці прокаріотичні мікроорганізми є убіквітарними, тобто їх можна ізолювати від всіх клінічно здорових теплокровних тварин і зовнішнього середовища, в яке вони потрапляють з фекаліями і іншими екскретами. Методи їх культуральної ізоляції і подальшої ідентифікації добре розроблені і ефективні, а їх пробіотична активність є доказаною. Тому в наших експериментах, ми рішили вивчити розповсюдженість і індикаторну роль цих убіквітарних прокаріотичних індигенних індикаторних пробіотичних мікроорганізмів (Atlas, 2005; Murray et al., 2005; Magee et al., 2015; Valchuk et al., 2015; Zazharska et al., 2017; Biben et al., 2019).

Мета роботи: мікробіологічний моніторинг пробіотичного профілю мікробіому товстого кишечника на біомоделі убіквітарних, резидентних мікроорганізмів, таких як *M. vaccae* & *A. viridans*, які є прокаріотичними індикаторами фізіологічного благополуччя макроорганізму і за дії перманентних несприятливих факторів зовнішнього середовища, зникають з мікробіому.

Матеріали і методи. Експериментальну роботу з отримання і підтримки прокаріотичних культур індигенних пробіотиків проводили в навчально-науковій лабораторії

та інфекційному віварії кафедри інфекційних хвороб факультету ветеринарної медицини Дніпровського ДАЕУ.

Ізоляцію пробіотичних мікобактерій проводили за загально прийнятими методами превентивної обробки проб-фекалій 20 % розчином сірчаної кислоти з експозицією не менше 20 хв і після ретельного відмивання і нейтралізації залишків кислоти робили висіви на середовище Левенштейна-Йенсена. Посіви культивували під гумовими корками впродовж 4-8 тижнів за 37-38 °С в термостаті. Морфо-тинкторіальні властивості та бактеріальну чистоту культури мікобактерій вивчали за фарбування мазків за Грамом і Циль-Нільсеном (Vlizlo et al., 2012). Видову приналежність ізольованих культур мікобактерій встановлювали відповідно до визначника бактерій Берджі (Magee & Ward, 2015).

Апатогенність ізольованих культур мікобактерій вивчали при інфікуванні чотирьох мурчаків з живою масою тіла 250-280 г при введенні суспензії бакмаси мікобактерій чотиритижневої культури в дозі 1 мг/см³ в ділянці паху. Спостерігали за тваринами впродовж трьох місяців. Відсутність патологічних змін свідчить за апатогенність і біобезпечність досліджуваної культури.

Ізоляцію пробіотичних аерококів проводили на індикаторних живильних штучних середовищах, оригінального складу на основі живильного агару 30,0 г, калію йодиду 30,0 г, розчинного крохмалю 10,0 г. Компоненти середовища розчиняли в 1 л дистильованої води, автоклаували за 1,5 атм 30 хв і в стерильному боксі розливали в чашки Петрі. В процесі інкубації за 37-38 °С через 24-48 год з'являються невеличкі колонії в S-формі темно-фіолетового кольору, що є видоспецифічною ознакою *A. viridans*. Здатність *A. viridans* продукувати пероксид водню і супероксидний радикал на підставі функціонування NAD-незалежної лактатоксидази і піруватоксидази детермінує окиснювальні властивості саме виду *A. viridans* і дає можливість проводити видову диференціацію. На підставі того, що *A. viridans* відносяться до оксидазо-позитивних прокариот, то при культивуванні на голодному агарі відбувається окиснення калію йодиду до двовалентного йоду, що призводить до фарбування колоній в темно-фіолетовий колір. І навпаки, фарбування колоній в червоний колір, свідчить про відновлювальні процеси, що є нетиповим для окиснювальних мікробіонтів. Чисті і ідентифіковані за Берджі культури *A. viridans* підтримували пасажуванням на простих живильних середовищах. Морфо-тинкторіальні властивості та бактеріальну чистоту ізольованих культур аерококів вивчали при фарбуванні мазків за Грамом і Романовським-Гімза.

Апатогенність ізольованих культур аерококів вивчали в біопробі на білих мишах, живою масою тіла 18-20 г. Добову бульйонну культуру аерококу в об'ємі 1,0 см³ з накопиченням бактерій не менш 1-2×10⁹ КУО/см³ вводили підшкірно, в ділянці спини і інтраперитонеально. На кожну біопробу використовували по 6 мишей. Спостерігали за тваринами впродовж двох тижнів. Відсутність патологічних змін свідчить про апатогенність і біобезпечність досліджуваної культури.

Ентеробактеріальний профіль мікробіому сканували за допомогою посіву суспензії фекалій на середовище Ендо методом Дригальського. З окремих колоній рубінового кольору з металевим блиском робили пересів на прості середовища і вивчали морфо-тинкторіальні характеристики бактерій при фарбуванні за Грамом і Романовським-Гімза. Патогенні потенції ізольованих ентеробактерій встановлювали аналогічно з аерококами.

Стафілококи отримували із зовнішнього середовища методом осадження мікроорганізмів на відкриту поверхню МПА, з подальшим пересівом чистої культури.

Антимікробні потенції неспецифічної резистентності вивчали за допомогою сканування біоактивності нейтрофільних гранулоцитів при формуванні ними в навколоклітинному просторі потенційно-патогенних прокариот пористого структурного утворення, яке складається з макромолекул нуклеїнових кислот (ДНК) та поліпептидів. Для

візуалізації агрегації фіксованих гранулоцитами прокариот використовують акридиновий помаранчевий (Brinkman et al., 2004; Zazharskyi et al., 2021).

Для отримання суспензії нейтрофільних гранулоцитів 10 см³ гепаринізованої кардіальної крові осаджували еритроцити відстоюванням за 37-38 °С впродовж 30 хв. Гранулоцити відділяли із суспензії лейкоцитів в градієнті щільності розчинів фікол-верографіну. Отриману завись центрифугували 45 хв за 1500 об/хв, з'являлося сіре кільце гранулоцитів, яке збирали і переносили в пробірки, тричі відмивали і доводили до концентрації $5,0 \times 10^6$ кл/л. Завись нейтрофільних гранулоцитів інкубували за 37-38 °С 30 хв з додаванням 0,1 см³ зависи ізольованих культур мікроорганізмів з концентрацією 1×10^9 КУО/см³, відповідно бактеріологічному стандарту каламутності. Мікобактерії додавали з концентрацією 1 мг/см³. Прокариоти використовували для дослідів в експоненціальній фазі культивування. Крім прокариотів додавали в завись нейтрофілів частинки латексу і в якості контрольного компонента використовували суспензію нейтрофілів без прокариот-активаторів.

При фарбуванні нейтрофільних гранулоцитів використовували 200,0 мкл робочого розчину фарби – акридинового помаранчевого в ізотонічному розчині кухонної солі з концентрацією 2 мкг/см³. Вивчали препарати за допомогою люмінесцентного мікроскопу МБД-15 за збільшення 90×15 з довжиною хвилі до 490 нм та емісією до 520 нм. В дослідних препаратах сегментовані ядра нейтрофілів фарбуються в яскраво-зелений колір, цитоплазма нейтрофільних лейкоцитів не фарбується. Цитоплазма клітин прокариот з нуклеїдом, який дифузно розташований і знаходиться в колоїдному стані фарбується в зелений колір. Навколклетинні формування нейтрофільних гранулоцитів мали вигляд сіточки з досить тонких зелених ниток, а прокариоти-активатори були помаранчевого кольору (Zazharska & Samoilenko, 2016).

При проведенні біологічних експериментів на лабораторних тваринах керувалися конвенцією із захисту та гуманним поводженням з хребетними наземними тваринами (Strasbourg, 1986), вимогами законодавства Європейського Союзу (EU) та директиви 2010/63/EU ВІД 22.08.2010.

Результати й обговорення. Для створення холодового негативного впливу на макроорганізм сформували дві групи аналогових рандомізованих мурчаків по 6 тварин в кожній. Середній показник живої маси тіла дорівнював $262,0 \pm 18,0$ г. Мурчаків розмістили в двох клітинах і впродовж двох тижнів тримали на карантині. Мурчаки були клінічно здорові, активно приймали корм. Перед початком досліду провели стартове мікробіологічне дослідження мікробіального профілю кишкового вмісту. Відібрали зразки фекалій і загально прийнятими методами виділили чисті культури прокариот.

Базисні властивості ізольованих мікобактерій.

Ізольовані мікобактерії, пофарбовані за методом Ціля-Нільсена, мали вигляд прямих паличок, довгих або коротеньких, яскраво-червоного кольору, які розташовані у полі зору поодинокі або скупченнями. Поряд з паличками зустрічались і дрібні кокові форми.

Мікобактеріальні прокариоти проявляли себе як факультативні анаероби та мікроаерофіли, були швидко зростаючими бактеріями, добре адаптованими до елективних поживних середовищ, на яких культивують мікобактерії. На елективно-селективному яєчному щільному середовищі Левенштейна-Йенсена ізольовані культури виростили на 4–5 добу культивування за 37,0 °С, з утворенням пігменту жовтого кольору в темряві і на світлі, тобто характерна ознака скотохромогенності. Також культура проявляла властивості солетолерантності та температурочутливості до 45,0 °С.

Мікобактерії були каталазоактивні, гідролізували твін-80, давали позитивну реакцію з телурітом К, проявляли амідазну активність, тобто проявляли позитивну реакцію на карбамід, нікотинамід, піроцинамід.

В біопробі на мурчаках мікобактерії були апатогенними. За комплексом ознак ізольовані мікобактерії були ідентифіковані як *M. vaccae*.

Базисні властивості ізольованих аерококів.

В препаратах-мазках, пофарбованих за Грамом, прокаріоти були представлені безкапсульними нерухомими кулястими невеликими клітинами фіолетового кольору, розташованими парами, тетрадами або скупченнями.

Факультативні-анаероби та мікроаерофіли добре ростуть на МПА і МПБ, на кров'яному агарі викликають альфа-гемоліз. Хемоорганотрофи з окисним метаболізмом, вуглеводи ферментують з утворенням кислоти. Каталазо-негативні. Желатин не розріджують; нітрати не відновлюють. Температурний оптимум 37-38 °С.

Диференційною ознакою виду є оксидазна активність, тобто потенційна спроможність аерококів при своєму рості окиснювати калій йодид до йоду в складі щільного живильного середовища (МПА). Як індикатор до складу МПА входить розчинний крохмаль. Після інкубації посівів за 37-38 °С впродовж 48 год навколо штриха аерококів з'являється темносинє забарвлення, діаметр якого повинен бути не менш 10 мм.

Сапрофіти, убіквітарні прокаріоти, населяють різноманітні екологічні ніші. Для лабораторних тварин апатогенні і виконують пробіотичні функції.

На підставі комплексу ознак ізольовані коки були ідентифіковані як *A. viridans*.

З проб-фекалій ізолювали апатогенну *E. coli*, а з повітря – *S. aureus* (рис.1, 2). Прокаріоти володіли типовими для виду базисними властивостями.

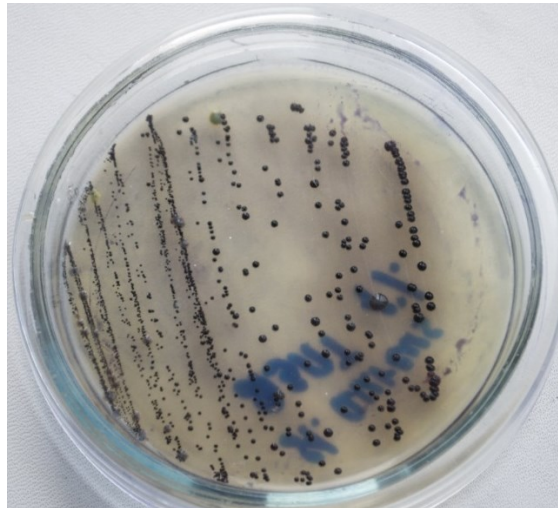


Рис. 1. Ізольована апатогенна *S.aureus* з повітря

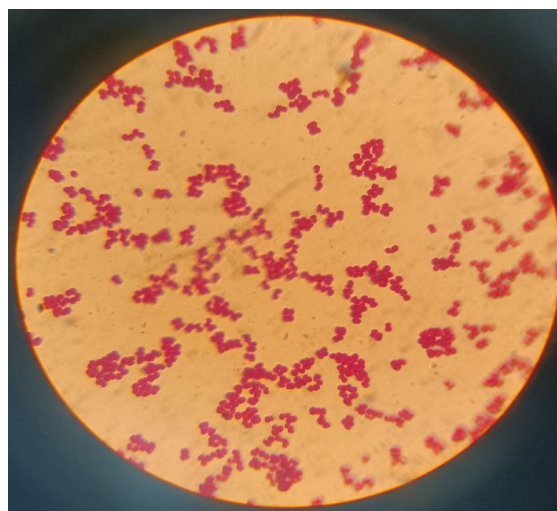


Рис. 2. Мікроскопія *S.aureus* з повітря

Через два тижні гіпотермії для мурчаків провели повторний мікробіологічний аналіз проб-фекалій. В результаті досліджень індикаторні прокаріоти фізіологічного благополуччя - *M. vaccae* & *A. viridans* в складі мікробіому були відсутні. Вульгарна мікрофлора виділялись у великій кількості, але це транзиторні мікроорганізми, які не володіють пробіотичними потенціями і є попередники доза-залежних факторних інфектопатологій.

Для скринінгу функціональних потенцій і імунобіологічної ефективності імунної системи за делеційним станом по відношенню до індигенних індикаторних мікробіонтів - *M. vaccae* & *A. viridans* провели дослідження імунокомпетентності клітинної ланки вродженого неспецифічного імунітету на прикладі антимікробної діяльності нейтрофільних гранулоцитів.

При мікроскопії пофарбованих і фіксованих препаратів провели кількісну і якісну оцінку вивчення послідовних стадій преформації нейтрофільних гранулоцитів за їх активізаційної дефрагментації. Встановили формування трьох видів кооперативних структур:

- а) клітини з сегментованим ядром;
- б) клітини з недиференційованим ядром;
- в) безладно, неструктуровано і несистемно розташовані яскраво-зелені волокна преформованої ДНК нейтрофільних гранулоцитів.

Далі підраховували по 100 сформованих структурних формувань і встановлювали відсотковий вміст кожного функціонального утворення. Визначали активність та інтенсивність фагоцитозу прокаріот нативними лейкоцитарними клітинами, кількість випадків потрапляння бактерій-активаторів в комірки сітки волокон преформованої ДНК. Підраховували: а) активність фагоцитозу (кількість нейтрофілів з сегментованим ядром в цитоплазмі яких знаходились прокаріоти); б) інтенсивність фагоцитозу (кількість прокаріот в 100 гранулоцитів); в) кількість трансформованих нейтрофільних структур з фіксованими в них прокаріотами; г) індекс інтенсивності фіксації прокаріот комірками сітки нейтрофільних структур з преформованої ДНК лейкоцитів.

При мікроскопії препаратів отриманих після пів-годинної інкубації за висі нейтрофілів за 37-38 °С без прокаріотичної і латексної індукції зафіксували до 52,3±1,1 % нетрансформованих нейтрофілів, тобто використані індуктори були малоефективні в трансформації нейтрофілів. Але активація нейтрофілів польовими варіантами *E. coli* & *S. aureus* вірогідно суттєво зменшують, до 39,8±1,3 %, кількість сегментоядерних клітин лейкоцитів. В аналоговому контролі зафіксували 22,4±1,4 % лейкоцитарних клітин з несегментованим ядром, тобто частки латексу і банальна прокаріотична мікрофлора зменшує потенційну можливість преформатації нуклеїнових кислот.

В процесі експериментів встановили, що поглинальна ефективність фагоцитозу у нейтрофільних лейкоцитів відносно банальної польової мікрофлори склала: 7,9±0,81 м.к./фагоцит для *S. aureus*; 7,2±0,6 м.к./фагоцит для *E. coli*; 7,4±0,7 м.к./фагоцит для часток латексу. Тобто, частки латексу не впливають на процес морфогенезу гранулоцитів внаслідок преформації нуклеїнових кислот і формування філаметозних просторових структур з нуклеопротейдів, і навпаки – банальна прокаріотична мікрофлора стимулює формування позаклітинних антимікробних структур. При цьому, біоактивні фактори протимікробної дії, які екскретуються в позаклітинний простір для формування навколоклітинних філаментозних структур і знаходяться в гранулах нейтрофілів не пошкоджують клітинний бар'єр слизових оболонок і не індукують запально-дегенеративні патофізіологічні процеси.

ВИСНОВКИ

1. Перманентний холодний стрес низької інтенсивності в діапазоні плюсових температур нижче рівня фізіологічного комфорту призводить до змін в якісному складі мікробіому товстого кишечника, що проявляється в елімінації індикаторних індигенних

пробіотичних прокаріот – *M. vaccae* & *A. viridans*, гіпофункції нейтрофільних гранулоцитів за формування преформованих філаментозних просторових нуклеопротейдних структур і прогресуючої імунодепресії з накопиченням в мікробіомі вульгарної мікрофлори з потенційною здатністю до колонізації внутрішнього середовища макроорганізму.

2. Пробіотичні індигенні прокаріоти – *M. vaccae* & *A. viridans* є активними індукторами преформації нуклеїнових кислот нейтрофілів і поліпептидів з формування антимікробної філаментозної сітки із фіксацією, фагоцитозом і знешкодженням, що є ефективним фактором вродженого неспецифічного імунітету, на відміну від банальної польової мікрофлори, яка є індиферентною або негативно впливає на фагоцитарну функцію нейтрофільних гранулоцитів.

3. Формування навколоклітинних ниткоподібних об'єднань з преформованої ДНК нейтрофільних гранулоцитів і поліпептидів з антимікробною активністю створює просторово орієнтовані сітчасті структури філаментозного характеру, які ефективно фіксують генетично несингенні клітинні утворення з подальшою дефрагментацією і цим біомеханізмом ефективно опосередковується антимікробна функція неспецифічного клітинного імунітету.

Перспективи досліджень. Ізоляція польових культур індигенних прокаріот з пробіотичними властивостями і скринінг їх розповсюдження в нативних екологічних нішах існування з подальшим використанням для стимуляції імунобіологічної потенції імунних механізмів антимікробного захисту і підвищення загальної резистентності макроорганізму з використанням мікробіологічних препаратів в несприятливих умовах зовнішнього середовища.

References

Allen, P.B., Salyer, S.W., Dubick M.A., Holcomb J.B., Blackbourne L.H. (2009). Preventing hypothermia: comparison of current devices used by the US army in an in vitro warmed fluid model. *J. Trauma*. № 69. P. S154–S161.

Atlas, R.M. (2010). *Handbook of microbiological media* / Boca Raton Fla. 2036.

Biben, I.A., Sosnitskiy, A.I., Zazharskiy, V.V. (2018). Immunobiyolohicheskaya modulyatsyya orhanyzma porosyat, yndutsyrovannaya symbyotykom «Subaéryn» Veterynarna medytsyna. *Mizhvidomchyy tematychnyy naukovyy zbirnyk*. 104. Kharkiv. 369 – 375 [in Russian].

Biben, I.A., Zazharskiy, V.V., Sosnitska, A.O., Kolosova, V.C. (2018). Probioticheskiye potentsii *Aerococcus viridans* na biomodeli organizma belykh myshey. *Veterinarna biotekhnologiya*. 32 (2). Buleten. Kіiv. 37 – 45. [in Russian].

Biben, I.A., Sosnitska, A.O., Udovytskiy, Ye.V., Zazharskiy, V.V. (2019). Immunobiologichni vlastyvosti pol'ovyykh kul'tur atypovyykh mikobakteriy. *Naukovo-tekhnichnyy byuleten' derzhavnoho naukovo-doslidnoho kontrolnoho instytutu veterynarnykh preparativ ta kormovyykh dobavok i Instytutu biolohiyi tvaryn*. 20. 2. 174 – 182. doi: 10.36359/scivp.2019-20-2.23 [in Ukrainian].

Biben, I.A., Sosnitska, A.O., Zazharskiy, V.V., Sosnitskiy, O.I. (2019). Epizootichniy shtam SA-18 *Pasteurella multocida* dlya vigotovlennya tsilnoklitinnogo bakterialnogo inaktivovanogo antigenu u skladi inaktivovanoi adyuvant-vaktsini proti pasterelozu ssavtsiv ta ptitsi, indukovanogo *Pasteurella multocida* serovarem A: pat. 135161 Ukrayina. *byul.* 12. 4. [in Ukrainian].

Brinkman, V., Rechard, U., Goosmann C. et al. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 303. 1532-1535.

Fuches, T.A., Abed, U., Goosmann C. et al. (2007). J. Cell. Biol. Novel cells death program leads to neutrophil extracellular traps 176 (2). 231-241.

Ganem, Y., Pomian, J.L., Laborde, L. et al. (2006). Ambiances termiques: travailler au froid // Documents pour le Medecin du Travail. 107. 3. 279 – 295.

Kassish, V.Yu., Ukhovskiy, V.V., Sosnytskyi, O.I., Biben., I.A., Zazharskiy., V.V. & Kassish, O.V. (2019). Ecologically safe method to control the epidemic situation on animal tuberculosis in Ukraine. *Biology. Svit medicini i biologii*. 2 (68), 220–225 [in Ukrainian].

- Magee, J.G. & Ward, A.C. (2015). Mycobacterium. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. – Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1-84.
- Mallet, M.L. (2002). Pathophysiology of accidental hypothermia. *Q. J. Med.* 95. 1. 775–785.
- Mattox, K., Moore, E., Feliciano, D. (2012). Trauma. New York : McGraw Hill Professional. 1224.
- Mohr, W.J., Jenabzaden, K., Ahrenholz, D.H. (2009). Cold injury. *Hand Clin* Vol. 25. 4. 481-496.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. (2005). Medical microbiology – Elsevier Mosby, 963.
- Valchuk, S.I. et al. (2015). Biologicheskiye svoystva aero kokkov i batsill – komponentov novogo assotsiativno-probioticheskogo kompleksa. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med.* - 2015. 6. 1. 57-62. [in Russian].
- Vlizlo, V.V., Fedoruk, R.S., Ratych I.B. et al., za red. V.V. Vlizla. (2012). Laboratorni metody doslidzhen u biolohiyi, tvarynnytstvi ta veterynarniy medytsyni: dovidnyk. Lviv: SPOLOM. 764 [in Ukrainian].
- Zazharska, N.V. (2023). Health of the dairy herd and indicators of milk quality. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 25(110), 99–103. <https://doi.org/10.32718/nvlvet11016> [in Ukrainian].
- Zazharska, N.V., & Biben, I.A. (2023). Means for pre-milking and post-milking processing of cow udders. *Bulletin of Sumy National Agrarian University. The Series: Veterinary Medicine*, (4(63), 43–50. <https://doi.org/10.32782/bsnau.vet.2023.4.7> [in Ukrainian].
- Zazharska, N.M., Kurban D.A., Holubieva O.V. (2017). Vmist zhyru, bilku, somatychnykh klityn u molotsi koriv i kiz v zalezhnosti vid kilkosti laktatsii. (Contain of fat, protein, somatic cells in cow's and goat's milk depending on number of lactation). *Naukovo-tekhnichnyi biuleten NDT's biobezpeky ta ekolohichnoho kontroliu resursiv APK (Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC)* 5 (4), 17–24. [in Ukrainian].
- Zazharska, N.M., Samoilenko Yu.V. (2016). Khimichni ta imunolohichni pokaznyky kozynoho molozyva ta moloka zalezhno vid periodu laktatsii (Chemical and immunological parameters of goat colostrum and milk depending on the lactation period). *Visnyk Dnipropetrovskoho derzhavnoho ahrarno-ekonomichnoho universytetu News of Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University.* 2(40). 70–75 [in Ukrainian].
- Zazharskyi, V., Bigdan, O., Parchenko, V., Parchenko, M., Fotina, T., Davydenko, P. et al. (2021). Antimicrobial activity of some furans containing 1,2,4- triazoles. *Archives of pharmacy practice.* 12 (2), 60-65 [in Ukrainian].